

神経発生と血管新生の共時性と因果性の追究

— バイオイメージングによる解析ならびに脳の栄養学のための文献調査 —

INVESTIGATION ON SYNCHRONICITY AND CAUSALITY BETWEEN NEUROGENESIS AND ANGIOGENESIS - BIOIMAGING ANALYSIS, AND LITERATURE SURVEILLANCE STUDY FOR NUTRITIONAL SCIENCE OF BRAIN -

森田 規之

Noriyuki MORITA

1. バイオイメージングによる解析

脳神経系の発生過程において、神経組織や神経系細胞の細胞機能、形態形成に関連する一連の事象と並行して、血管新生や血管の走行のパターン形成が巧妙に制御される。これまで、マウス小脳において前後方向に走る縦縞状の小脳皮質傍矢状帯域の境界部に移動中の顆粒ニューロンを見いだしており、この部位に高頻度で検出される血管構造がニューロンの移動や小脳皮質の層構築に関与する可能性を検討してきた。また、細胞接着・認識機能を有するEph-ephrinシグナリング関連遺伝子群のメンバーが、神経突起伸長やシナプス形成に関与することに加えて、血管新生を制御する因子でもあることから、蛍光抗体染色法によって発現細胞をタンパク質レベルで同定してきた。

今年度は、Eph-Ephrinメンバー遺伝子の発現細胞の同定と発生段階における出現時期を、*in situ* hybridization法によって明らかにすることを試みた。*in situ* hybridization法とは遺伝子の転写産物を検出・可視化する方法である。その実施には分子生物学と組織解剖学の双方の知識、実験手技、研究環境が要求される実験系であるが、遺伝子機能、

複数の遺伝子間の相互作用、遺伝子転写調節機構を明らかにするためには不可欠なものである。同一細胞内での注目する遺伝子群の一連の発現時期の相違、隣接細胞間でのリガンドとレセプターの遺伝子発現の対応などを一つ一つ明らかにすることが、発生過程における様々な事象の共時性と因果性の追究につながる。

本学での研究遂行上の制約から、組み替えDNA実験を伴わぬようRCR法によって遺伝子プローブの鋳型を調製し、*in vitro* 転写による非放射性標識cRNAプローブを作成する系を新たに構築した。Eph-Ephrinメンバー遺伝子の発現動態から、発達期のマウス小脳において、神経回路網形成期の段階に応じて、軟膜から深部へと小脳皮質層構造を放射状方向に貫く血管から横方向への分岐が制御的に生じることを示唆する所見を得た。

2. 脳の栄養学のための文献調査研究

昨年度に引き続き、血液中から脳内への栄養素の取り込みや移行をコントロールする血液脳関門(Blood brain barrier)に注目した。米国国立衛生研究所(NIH)医学図書館

(NLM)の国立生物工学情報センター(NCBI)の運営による医学関係文献二次情報データベース PubMedを用いて欧文文献を検索抽出し、入手した文献の数々を精査した。

注目した今年度の総説論文として、“**The blood-brain barrier: Connecting the gut and the brain. Regulatory Peptides, 149(1-3) 11-14, 2008**”を紹介する。脳と消化管の間の情報伝達の要として機能する血液脳関門が示されている。血液脳関門におけるペプチドやホルモン、調節タンパク質の選択的な輸送、インスリンによる血液脳関門でのアミノ酸や薬物の輸送の制御、消化管ホルモンによって血液脳関門から放出されるサイトカインや一酸化窒素の摂食や食欲への影響、などがメカニズムの一端として詳述されている。

今後の文献調査を進めていく上で、1)血液脳関門における脂肪酸輸送機構とその制御: フリップフロップ機構やトランスロカーゼ、脂肪酸結合タンパク質の動態、2)血液脳関門とホルモン: インスリンと脳内へのアミノ酸輸送、インスリンの脳内移行、インスリン抵抗性とニューロン代謝障害やアルツハイマー病、などに注目する。

3. 今年度発表論文の要旨

1) Opalin, a Transmembrane Sialoglycoprotein Located in the Central Nervous System Myelin Paranodal Loop Membrane.

Fumio Yoshikawa, Yumi Sato, Koujiro Tohyama, Takumi Akagi, Tsutomu Hashikawa, Yuko Nagakura-Takagi, Yukiko Sekine, Noriyuki Morita, Hiroko Baba, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Akira Sato, and Teiichi Furuichi
The Journal of Biological Chemistry, 283(30): 20830–20840, 2008

髄鞘(ミエリン)の最外側領域を占める一連のパラノードループは、細胞膜同士が密着したコンパクトミエリン構造とは異なり、細胞膜間に細胞質を有している。隣接するループの細胞外表面は一定の間隔を保ち、細胞膜は接合部として特殊化された構造をとる。コンパクトミエリンを形

成するタンパク質の研究が大きく進展しているのに対し、パラノードループの膜構成タンパク質の理解は進んでいない。この研究では、パラノードループの新規の膜タンパク質としてのオパリンについて、その生化学的特徴と発現動態を報告する。マウスのオパリンタンパクは、短いN末端細胞外ドメイン(アミノ酸残基1–30)、膜貫通領域(31–53)、長いC末端細胞内ドメイン(54–143)で構成される。オパリンは、マウスにおいて中枢神経系ミエリンに豊富に発現するが、末梢神経系ミエリンでは認められない。酵素的糖鎖除去により、オパリンはN-結合型とO-結合型双方の糖鎖を有し、少なくともO-結合型糖鎖が陰性荷電をもつシアル酸を含有することが明らかとなった。N-結合型糖鎖結合部位として6番目と12番目のアスパラギン残基、O-結合型糖鎖結合部位として14番目のスレオニン残基を同定した。部位特異的突然変異を糖鎖結合部位に導入したところ、オパリンの細胞膜表面への局在が障害された。免疫組織化学解析では、オパリンの陽性反応が稀突起膠細胞の細胞体と突起に加えて、有髄神経線維において螺旋状に認められ、ミエリンのパラノードループへの集積が観察された。イムノゴールド法による電子顕微鏡観察でも、オパリンのパラノードループ細胞膜の特定部位への局在が示された。これらの結果は、シアル酸を高度に含有する糖タンパク質オパリンが、中枢神経系のミエリンパラノードループの細胞膜間で機能を果たすことを示唆する。

2) Cerebellar development transcriptome database (CDT-DB): Profiling of spatio-temporal gene expression during the postnatal development of mouse cerebellum.

Akira Sato, Yukiko Sekine, Chihiro Saruta, Hirozumi Nishibe, Noriyuki Morita, Yumi Sato, Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Toshio Kojima, and Teiichi Furuichi
Neural Networks, 21(8): 1056–1069, 2008

脳の発達と機能のために遺伝情報の多くの部分が充てられている。マウスにおいて小脳の神経回路は、細胞や形態形成に関連する一連の現象(ニューロンの増殖、移動、

軸索伸長、樹状突起形成、シナプス形成、髄鞘形成など)を通じて生後3週の間で発達する。これらの現象のすべてが特異的な遺伝子群の組み合わせで制御され、遺伝子の時空間的な発現プロファイルはゲノムにコードされている。小脳の神経回路発達の遺伝子基盤を理解するため、発達の各段階における遺伝子発現動態をトランスクリプトームとしてゲノムワイドに解析した。遺伝子発現データは、空間的(細胞、領域)には *in situ* ハイブリダイゼーション法を、時間的(発達段階)には蛍光ディフュージョンディスプレイ、ジーンチップ、マイクロアレイ、RT-PCR法を適用して収集し、ジーンオントロジー(遺伝子、遺伝子産物の機能定義と分類の体系)と、解剖学的構成(小脳を構成する細胞タイプや回路構造)から、アノテーションを行った。アノテートした実験データを統合し、ナレッジリソースデータベースとして小脳発達トランスクリプトームデータベース(CDT-DB)を構築して、様々なバイオインフォマティクスデータベースウェブサイト上の関連情報にシームレスリンクを張った。CDT-DBは、独自のインフォマティクスツールとして発達期マウス脳における遺伝子の時空間的発現様式情報を検索できることに加えて、小脳の発達を担うトランスクリプトームの解明への道を拓くものでもある。

3) DSCAM Deficiency Causes Loss of Pre-Inspiratory

Neuron Synchronicity and Perinatal Death.

Kenji Amano, Morimitsu Fujii, Satoru Arata, Takuro Tojima, Masaharu Ogawa, Noriyuki Morita, Atsushi Shimohata, Teiichi Furuichi, Shigeyoshi Itohara, Hiroyuki Kamiguchi, Julie R. Korenberg, Akiko Arata, and Kazuhiro Yamakawa

The Journal of Neuroscience, 29(9): 2984-2996, 2009

ダウン症候群細胞接着分子(DSCAM)は、神経系における接着分子の一つであり、神経発生において多彩な働きを有する。私たちは*Dscam*遺伝子座を破壊したマウスを作成し、その全欠失変異体(*Dscam*^{-/-})が生後24時間以内に死亡することを見だし、不規則呼吸、高二酸化炭素血症に対する呼吸応答の低下を全身プレチスモグラフィによって明らかにした。*Dscam*^{-/-}マウスの摘出延髄-脊髄標本において、横隔神経を含むC4レベル脊髄前根が頻発性無呼吸を伴う不規則なリズムで活動すること、さらには、電位感受性色素を用いた光学イメージング測定法により、呼吸リズムを形成する吻側延髄腹外側野の吸息先行型ニューロン集団の同期的活動が消失していることを見いだした。一方、*Dscam*^{+/-}マウスは著明な異常もなく成獣まで生存したが、全欠失変異体に比べて軽度の不規則呼吸が認められた。これらの結果は、中枢性呼吸制御においてDSCAMタンパクが、用量依存的な作用様式で決定的な役割を果たしていることを示唆する。